

# 大腸菌 GTP cyclohydrolase IIによる自然突然変異抑制機構の研究

著者	小林 昌彦
号	41
学位授与番号	理第1116号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/38597">http://hdl.handle.net/10097/38597</a>

氏名・（本籍）	こ ばやし まさ ひこ 小 林 昌 彦
学位の種類	博士（理 学）
学位記番号	理 第 1 1 1 6 号
学位授与年月日	平成 10 年 3 月 4 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
研究科，専攻	平成 8 年 3 月 31 日 東北大学大学院理学研究科 （博士課程）生物学専攻退学
学位論文題目	大腸菌 G T P cyclohydrolase II による 自然突然変異抑制機構の研究
論文審査委員	（主査）教 授 山 本 和 生 教 授 四 釜 慶 治，教 授 西 谷 和 彦

## 論 文 目 次

要 約  
序  
実験の材料と方法  
結 果  
考 察  
謝 辞  
略 記  
参 考 文 献  
図 の 説 明  
表  
図

## 論 文 内 容 要 旨

生物は正常代謝過程の副産物として活性酸素を産生するために，常にその攻撃にさらされている。活性酸素はタンパク質や脂質，炭水化物，ヌクレオチドなど，ほぼ全ての生体分子を酸化し損傷する。活性酸素によってもたらされたヌクレオチドやDNAの損傷は100種以上を超えるとされ，その中には変異原性や致死性をもつ損傷も含まれる。なかでも酸化グアニンの生成はその主要部分を占める。これらの酸化塩基は自然突然変異の原因となり，発癌や遺伝子疾患を導く。肺癌組織のDNA中では，酸化損傷塩基が正常コントロールより9倍も多く存在し，アルツハイマー病においても酸化修飾塩基の修復に関わる遺伝子に問題がある可能性が示唆されている。

この酸化塩基の危険性を回避するために，生物は多くの修復酵素を保有しており，大腸菌でもっともよく研究されている。それらの修復酵素間には，多くの機能的重複がみられ，損傷DNAの修復の重要性が

うかがわれる。真核生物でも大腸菌と類似の酵素が数多く発見されているが、大腸菌の対応酵素と単純には一対一の対応をとっておらず、基質特異性などに多くの違いがみられる。

活性酸素はグアニンを8-oxo-Gに酸化する。ヌクレオチドプール中のdGTPが酸化されると8-oxo-dGTPになる。8-oxo-dGTPはDNA複製時にDNA中のシトシンとのみならずアデニンとも対を形成するので、ミスペアでDNAに取り込まれ、結果としてA:T-C:Gトランスバージョン変異を引き起こす。この変異を防ぐ酵素として、これまで唯一MutTが明らかにされた。MutTは8-oxo-dGTPを8-oxo-dGMPに分解し無害化する。そのため*mutT*欠損大腸菌は高い変異頻度を示す。この高い変異頻度を利用して、活性酸素によって生じる変異原性損傷塩基8-oxo-dGTPを修復する新たな遺伝子を、大腸菌からクローニングしようと試みた。大腸菌*mutT*欠損株を用いて、大腸菌ゲノムライブラリーをスクリーニングし、*mutT*欠損株の高い変異頻度を抑制する遺伝子として*ribA*遺伝子をクローニングした。*ribA*はリボフラビン合成系酵素の一つGTP cyclohydrolase II タンパク質 (GCH II) をコードする遺伝子であり、GCHIIはGTPからギ酸とピロリン酸を切り離し、2,5-diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinone 5'-phosphate を産生する21.8kDaのシングルポリペプチドタンパク質である。*ribA*を*mutT*欠損株に導入した場合、ベクターのみの場合に比べて30倍も変異を抑制した。GCH IIを精製して*in vitro*で活性を調べた結果、GCHIIはリボフラビン合成反応におけるGTP cyclohydrolase II 活性に加えて、8-oxo-dGTPおよび8-oxo-GTPに対するpyrophosphatase活性であるMutT活性をも有していた。GTP、8-oxo-dGTP、8-oxo-GTPの3基質に対する $K_m$ 値がどれも同程度であることから、GCHIIのMutT活性はGTP cyclohydrolase II活性と同様にGCHIIの正規の活性といえる。これより、GCHIIはリボフラビン合成系酵素として機能しているだけでなく、活性酸素によって生じた変異原性ヌクレオチドの除去活性を有する2機能性の酵素であることを明らかにした。さらに、変異抑制作用の反応機構をもとに、リボフラビン合成反応におけるこれまで未知であった反応機構のモデルを提唱した。

## 論文審査の結果の要旨

好気性生物が行う酸素代謝の結果、生物体内には多様な活性酸素種が形成される。このような活性酸素は、細胞膜や核酸を攻撃し損傷を作る。核酸に出来た活性酸素による損傷は、自然突然変異の主要な原因として注目を浴びると共に、がんや老化の原因となることが近年明らかになってきた。一方生物は、活性酸素による塩基損傷を修復する機構を獲得し進化してきた。このような修復系を欠損した場合、大腸菌では、自然突然変異が非常に高いmutatorと呼ばれる。

小林昌彦提出の論文では、ヌクレオチドプールのdGTPの酸化損傷、8-oxodGTPの修復酵素として知られている大腸菌MutTタンパク質を、バックアップする修復系が存在することを予想し、その遺伝子をクローニングすること、及びその遺伝子産物の機能を明らかにしようとした。

大腸菌*mutT*株を相補する遺伝子を大腸菌遺伝子ライブラリーからスクリーニングしたところ、得られた1つの遺伝子は、大腸菌*ribA*遺伝子をコードしていた。RibAタンパク質はGTPを基質として、リボフラビンを生合成する反応の最初の過程に関わる酵素である。RibAタンパク質が8-oxodGTPを分解する機構を明らかにするため、RibAタンパク質を精製し、*in vitro*で調べたところ、RibAタンパク質は、8-oxodGTPだけでなく、8-oxoGTPも基質にして、ピロリン酸を解離する機能を持つことを明らかにした。即ち、従来から知られている、GTPを基質にリボフラビンを作る作用の他に、8-oxo(d)GTPを基質にする機構も存在することを初めて明らかにした。

次に、RibAタンパク質が8-oxo(d)GTPを認識する機構について実験し、グアニン8Cが水酸化された結果、GTPの立体構造が変化し、RibAによっても認識させることを示した。

本論文で小林昌彦はRibAタンパク質の機能について全く新しい作用機構を提案した。これらの成果は自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を備えていることを示している。したがって、小林昌彦提出の論文は博士（理学）の学位論文として合格と認める。